



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

**Dipartimento di Farmacia
Corso di Laurea Specialistica in
Chimica e Tecnologia Farmaceutiche**

Tesi di Laurea

Valutazione dell'attività antiossidante, antinfiammatoria, antifibrotica e
cicatrizante di estratti di *Chelidonium majus*

Relatori

Dott.ssa Anna Maria Bianucci

Correlatore

Dott. Daniele Pietra

Dott.ssa Alice Borghini

Candidata

Milena Montinaro

SSD CHIM08/BIO14
Anno Accademico 2012/2013

INDICE

	pag.
Riassunto.....	6
Introduzione.....	9
Classificazione delle ferite.....	10
Processi riparativi.....	10
La cute: struttura e funzione.....	11
Processo di guarigione delle ferite.....	13
<i>Fase di coagulazione ed emostasi.....</i>	<i>14</i>
<i>Fase infiammatoria.....</i>	<i>16</i>
<i>Fase infiammatoria tardiva.....</i>	<i>21</i>
<i>Fase proliferativa.....</i>	<i>22</i>
<i>Fase di rimodellamento.....</i>	<i>24</i>
La fibrosi come anomalia del processo di guarigione.....	26
Fibroblasti e fibrosi.....	27
Specie reattive dell'ossigeno nel processo di guarigione delle ferite.....	28
Citochine proinfiammatorie.....	30
Chemochine.....	38
Fattori della crescita	40
Prospettive terapeutiche.....	42
<i>Chelidonium majus L.....</i>	<i>43</i>
 Scopo della tesi.....	 45
 Parte sperimentale.....	 47
Metodologie.....	48
Analisi HPLC per la determinazione della concentrazione di alcaloidi isochinolinici in estratti di <i>C. majus</i>	48
Colture cellulari e loro trattamenti.....	50

Saggio di vitalità cellulare WST-1 a 18 e 42 ore.....	51
Determinazione qualitativa e quantitativa delle citochine infiammatorie nel sovrnatante cellulare.....	52
Valutazione della proliferazione e della morfologia cellulare.....	54
Fissazione delle cellule con metanolo.....	54
Protocollo di colorazione delle cellule con Sirius Red per il collagene.....	54
Conteggio delle cellule.....	55
Quantificazione del collagene prodotto dalle cellule mediante eluizione di Sirius Red.....	55
Valutazione dell'attività antiossidante antiradicalica.....	55
Analisi statistica.....	57
Risultati.....	59
Discussione e conclusioni.....	70
Ringraziamenti.....	80
Acronimi.....	82
Bibliografia.....	86

RIASSUNTO

Background. Nella patologia odierna le ferite sono ancora un problema clinico e le loro complicazioni rappresentano una frequente causa di stati patologici di varia gravità.

Una ferita cutanea è definita come un danno o una distruzione delle normali strutture anatomiche e della funzionalità del tessuto interessato.

La guarigione delle ferite è un processo dinamico e complesso che coinvolge una sequenza di eventi cellulari coordinati: attraverso il processo di emostasi, la risposta infiammatoria acuta, la formazione del tessuto di granulazione, la riepitelizzazione e il rimodellamento, l'organismo cerca di ripristinare l'integrità strutturale e la completa o parziale funzionalità del tessuto. La guarigione delle ferite cutanee comincia nel momento stesso del ferimento e coinvolge cellule presenti nel sito della lesione, cellule migrate da aree diverse dell'organismo (cheratinociti, cellule endoteliali, fibroblasti, cellule infiammatorie) e mediatori dell'infiammazione (citochine, chemochine, fattori della crescita). Anomalie in tale sequenza di eventi possono portare ad una insufficiente cicatrizzazione con riapertura della ferita o, al contrario, il processo di guarigione può terminare con una esuberante produzione di tessuto connettivo. Cicatrici ipertrofiche, cheloidi e scleroderma sono esempi di fibrosi della pelle, ovvero di alterazioni caratterizzate da un accumulo eccessivo di matrice extracellulare nel sito della lesione a causa di uno squilibrio tra produzione e degradazione dei componenti del tessuto connettivo. Sebbene al momento i meccanismi patogenici alla base di tali fenomeni non siano del tutto chiariti, molte ricerche concordano sul fatto che l'interleuchina-6 (IL-6) e il fattore trasformante beta-1 (TGF- β 1) svolgano un ruolo chiave in tali processi. Altri studi evidenziano che numerosi aspetti della guarigione delle ferite sono sotto il controllo delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) rilasciate dai macrofagi migrati nel sito della lesione; un eccesso nella concentrazione delle specie ROS porta alla condizione di stress ossidativo, limitando il processo di guarigione e causando danno tissutale e perpetrazione dello stato di non guarigione della ferita.

Obiettivo. Appare dunque evidente che al fine di favorire i processi di rigenerazione e guarigione della cute è utile stimolare la vitalità cellulare, favorire la cicatrizzazione, stimolare la proliferazione e la migrazione di fibroblasti, cellule endoteliali e cheratinociti, ridurre lo stato infiammatorio ed il danno ossidativo.

Scopo di questo lavoro è l'identificazione di potenziali agenti antinfiammatori, antifibrotici, cicatrizzanti e citoprotettivi derivanti dal *Chelidonium majus* L. (*C. majus*), una pianta nota nella medicina popolare per il trattamento di lesioni cutanee.

Metodi. Il lavoro sperimentale di questa tesi si è articolato nelle seguenti fasi:

- valutazione di svariati estratti di *C. majus* in relazione alla loro composizione in alcaloidi;
- creazione di un protocollo per la valutazione dell'eventuale attività antiradicalica degli estratti di *C. majus*;
- messa a punto di specifici protocolli per la creazione di un modello in vitro di fibrosi;
- esecuzione di saggi biologici su fibroblasti dermici umani (HDF). Le cellule HDF sono state trattate con svariati estratti in condizioni basali ed in condizioni che simulano un danno ossidativo (trattamento con H_2O_2) o uno stato fibrotico (trattamento con TGF- β 1).

Risultati e Conclusioni. Di tutti gli estratti saggiati, due in particolare hanno dato risultati molto incoraggianti in termini dei loro effetti sulla proliferazione, morfologia e vitalità cellulare. La scelta del modello sperimentale è risultata di particolare interesse perché ha permesso di paragonare stato basale delle cellule e stati alterati (simulazione di stato fibrotico e di danno ossidativo). Interessante anche la stima delle proprietà antiradicaliche di tali estratti in relazione al consumo del radicale libero DPPH.

Gli estratti saggiati sono risultati quindi essere in grado di modulare i parametri biologici presi in esame in maniera promettente per trattamenti terapeutici e cosmetici.

INTRODUZIONE

Nella patologia odierna le ferite sono rimaste un problema clinico rilevante e le loro complicazioni rappresentano una frequente causa di stati patologici di varia gravità, in alcuni casi mortali. Molti sforzi sono stati fatti per capire la fisiologia delle ferite e il loro processo di guarigione. Il grande impatto sociale ed economico delle ferite è una conseguenza dell'aumento della loro incidenza a causa di una popolazione sempre più anziana. Oltre ad un elevato numero di ferite acute c'è un ampio numero di ferite croniche associate a patologie che direttamente o indirettamente portano al danneggiamento del tessuto cutaneo. La prevalenza di ferite croniche aumenta con l'età. È stato stimato che le ferite croniche affliggono circa 120 persone su 100000 in una età compresa tra i 45 e i 65 anni e aumenta a 800 persone su 100000 in età superiore ai 75 anni.

Una ferita è definita come un danno o una distruzione delle normali strutture anatomiche e delle loro funzioni e può andare da una semplice lesione dell'integrità epiteliale della cute fino a configurarsi come una lesione profonda che si estende al tessuto sottocutaneo con danneggiamento di altre strutture: tendini, muscoli, vasi, nervi.

Le ferite possono avere una eziologia accidentale, intenzionale o possono essere il risultato di una patologia. Il ferimento, indipendentemente dalla causa, danneggia il tessuto e distrugge l'ambiente locale.

La guarigione delle ferite è un processo dinamico e complesso che coinvolge una sequenza di molecole e di eventi cellulari. Attraverso lo sversamento del plasma con coagulazione e aggregazione piastrinica, la riepitelizzazione e il rimodellamento del tessuto danneggiato, l'organismo cerca di ripristinare l'integrità e la funzionalità del tessuto.

La guarigione delle ferite cutanee è un fenomeno a più tappe che comincia nel momento stesso del ferimento e coinvolge le cellule presenti nel sito e le cellule migrate da aree diverse dell'organismo (cheratinociti, cellule endoteliali, fibroblasti, cellule infiammatorie), la matrice extracellulare e i mediatori solubili. In tale processo vengono coinvolti mediatori dell'infiammazione e fattori della crescita che influiscono sulle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare. L'insieme di questi processi presiede alla proliferazione, migrazione e differenziazione cellulare, alla riepitelizzazione, all'angiogenesi e al rimodellamento.

Una ferita può essere dichiarata guarita quando il tessuto interessato abbia assunto di

nuovo la normale struttura anatomica e la sua funzionalità in un tempo ragionevole. Fattori locali e sistemici possono alterare il normale processo di guarigione causando la cronicizzazione della ferita (T. Velnar, T. Bailey, V. Smrkolj, 2009).

CLASSIFICAZIONE DELLE FERITE

Le ferite possono essere classificate in base a vari criteri uno dei quali è il tempo di guarigione. In base al tempo le ferite possono essere distinte in:

- *ferite acute*: sono ferite che si rimarginano da sole seguendo il normale *pathway* di guarigione della lesione e portando al completo recupero anatomico e funzionale della parte interessata. Il tempo di guarigione può variare dai 5-10 giorni fino ad una trentina di giorni. Coinvolge solo i tessuti molli ed è causata da eventi traumatici modesti o di breve durata;
- *ferite croniche*: sono ferite che non seguono il normale processo di guarigione. Tale processo risulta incompleto o disturbato da vari fattori come infezioni, ipossia tissutale, necrosi, eccesso di citochine infiammatorie. Il continuo stato di infiammazione della ferita crea una cascata di risposte che perpetrano lo stato di non guarigione.

Altri criteri di classificazione delle ferite includono: l'eziologia (contusioni, abrasioni, lacerazioni, tagli, ustioni), lo sviluppo della contaminazione (ferite asettiche, ferite contaminate, ferite settiche), le caratteristiche morfologiche (Robbins PICCIN 2000 VI ed.).

PROCESSI RIPARATIVI

La risposta tissutale a un danno avviene per:

- *rigenerazione*, cioè per ricostruzione dei tessuti lesi con nuovo tessuto dello stesso tipo di quello danneggiato. La rigenerazione richiede che la struttura fornita dal tessuto connettivo sia integra;
- *guarigione*, cioè per sostituzione con tessuto connettivo e formazione di cicatrice. Si verifica in caso di perdita tissutale di notevole entità e danneggiamento della matrice extracellulare (ECM). Tuttavia, se il danno persiste, la ferita diventa cronica

e la lesione tissutale e la riparazione per guarigione possono verificarsi contemporaneamente. La deposizione di tessuto connettivo in queste condizioni è definita fibrosi.

Si può avere una guarigione per:

- *prima intenzione* se il fenomeno lesivo determina la morte di un limitato numero di cellule causando una piccola distruzione della continuità della membrana basale; la guarigione sarà un processo relativamente rapido;
- *seconda intenzione* se il fenomeno lesivo porta alla perdita di un'ampia porzione di tessuto; la guarigione sarà più complessa.

Fattori fisiopatologici e metabolici possono influire sulla guarigione delle ferite e condurre ad un esito incompleto. Questi fattori includono cause locali (edema, ischemia, ipossia tissutale, infezioni, necrosi, sbilanciamento dei fattori di crescita) e cause sistemiche (disordini metabolici e malattie preesistenti). Alla fine si ha alterazione del processo di guarigione con transizione da una ferita acuta a ferita cronica (Robbins PICCIN 2000 VI ed.).

LA CUTE: FUNZIONE E STRUTTURA

La cute è una spessa membrana che riveste l'intera superficie corporea continuandosi, in corrispondenza degli orifizi naturali del corpo, con le membrane mucose. La cute svolge una funzione di protezione nei confronti di agenti nocivi chimici, fisici o microbiologici, rappresentando la barriera tra l'interno e l'esterno dell'organismo; esplica anche una funzione di termoregolazione attraverso fenomeni di vasocostrizione, vasodilatazione e sudorazione. Svolge infine una funzione nervosa recettiva essendo sede di numerose terminazioni nervose (Proksch *et al.*, 2008).

La cute è formata da uno strato superficiale, l'epidermide, e da uno strato sottostante, il derma. Profondamente al derma è presente lo strato connettivo sottocutaneo (o ipoderma).

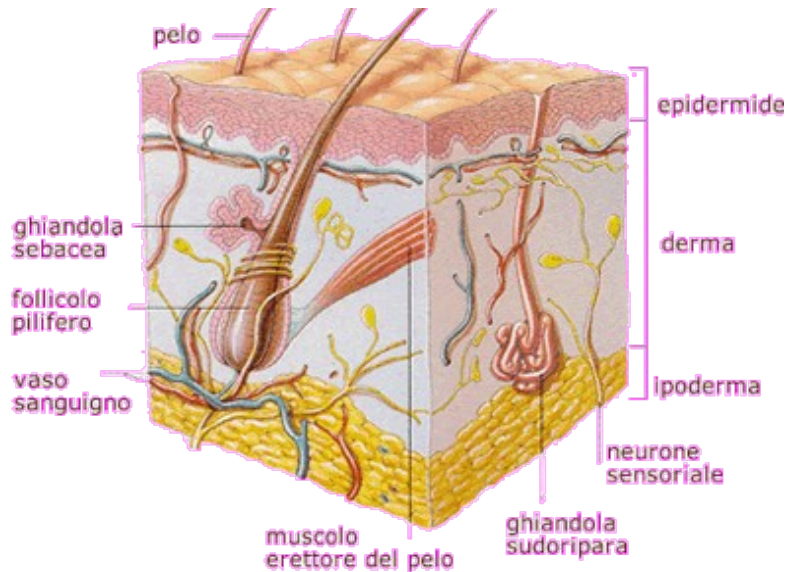


Fig. 1: struttura della cute

Epidermide

È costituita da un epitelio pavimentoso stratificato cheratinizzato privo di vasi sanguigni. È attraversata dai condotti delle ghiandole cutanee (ghiandole sudoripare e ghiandole sebacee) e dai peli, filamenti sottili e flessibili presenti su tutta la superficie cutanea esterna. Procedendo dalla profondità alla superficie, nell'epidermide si possono individuare 5 strati cellulari: strato basale, strato spinoso, strato granuloso, strato lucido e strato corneo. Gli strati basale e spinoso formano nell'insieme lo strato germinativo.

Strato basale: è formato da uno strato di cellule cubiche o cilindriche con grosso nucleo da cui originano, per intensa proliferazione, i cheratinociti degli strati sovrastanti. Tali cellule poggiano sulla membrana basale alla quale sono ancorate mediante emidesmosomi, e aderiscono a quelle vicine per mezzo di interdigitazioni e di desmosomi.

Strato spinoso: è costituito da cellule disposte in 3-7 strati di forma poliedrica e separate una dall'altra da sottili spazi intercellulari. Le cellule presentano brevi espansioni del citoplasma, dette spine, che si connettono ad analoghe spine delle cellule contigue.

Strato granuloso: è formato da cellule appiattite disposte in 2-6 strati.

Strato lucido: è costituito da vari piani di cellule prive di nucleo.

Strato corneo (o desquamante): è formato da uno strato continuo di corneociti connessi attraverso corneodesmosomi ed incorporati nella matrice extracellulare organizzata in

strati lamellari di lipidi. I corneociti non sono altro che cheratinociti differenziati che hanno perso il nucleo. La cheratina circonda la cellula che si trova immersa in una matrice extracellulare ricca di lipidi. I corneociti sono connessi tra loro tramite desmosomi. Lo strato corneo è la principale barriera contro la penetrazione cutanea di agenti chimici e biologici.

Derma

Il derma è lo strato connettivale sottostante all'epidermide. Il piano più superficiale in contatto con la faccia profonda dell'epidermide è detto strato papillare: è formato da connettivo fibrillare denso, ricco di fibre elastiche con vasi e terminazioni nervose. Lo strato del derma, sottostante allo strato papillare, è detto strato reticolare ed è caratterizzato da formazioni pilifere e ghiandolari.

Ipoderma

L'ipoderma è costituito da connettivo lasso con numerose fibre elastiche e vi si distinguono:

- uno strato superficiale, detto strato areolare (o lobulare), in continuità con lo strato profondo del derma mediante tralci fibrosi che circoscrivono lobuli di tessuto adiposo;
- uno strato intermedio costituito da una lamina di connettivo denso detta fascia sottocutanea;
- uno strato profondo detto strato lamellare.

La cute, dunque, è una barriera protettiva molto complessa costituita da vari componenti. La modificazione di uno di essi porta all'alterazione della funzione di barriera della pelle, una condizione comune in varie patologie (Pasqualino, Panattoni UTET 2002).

PROCESSO DI GUARIGIONE DELLE FERITE

Il processo riparativo delle ferite avviene in tutti i tessuti e gli organi del corpo. Si tratta di un fenomeno complesso che coinvolge e coordina sistemi immunologici e biologici. Sebbene il processo di guarigione delle ferite sia continuo, è stato arbitrariamente diviso in quattro fasi allo scopo di comprendere i processi fisiologici che avvengono nel sito della

lesione e nei tessuti circostanti: coagulazione ed emostasi, infiammazione, proliferazione, rimodellamento tissutale (Kiritsy, Lynch, 1993).

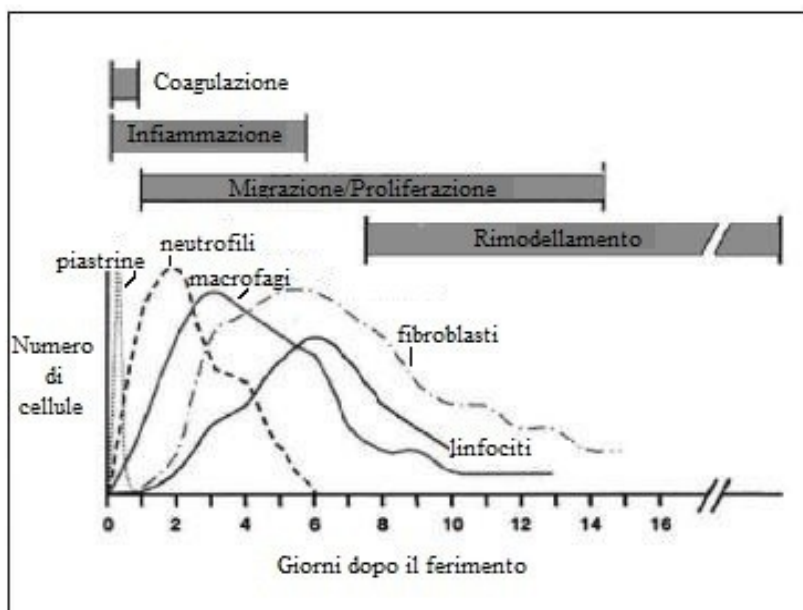


Fig. 2: rappresentazione delle varie popolazioni cellulari coinvolte durante le fasi del processo di guarigione delle ferite in funzione del tempo trascorso dal ferimento. (Figura modificata tratta da T. Velnar, T. Bailey, V. Smrkolj, 2009).

1) FASE DI COAGULAZIONE ED EMOSTASI

Immediatamente dopo la formazione della ferita, hanno luogo nel sito della lesione la coagulazione e l'emostasi. L'obiettivo immediato di questi meccanismi è di prevenire il sanguinamento. Un secondo obiettivo a più lungo termine consiste nel fornire una matrice provvisoria per le cellule infiltranti delle fasi successive del processo di guarigione. L'*emostasi* è l'arresto dell'emorragia e costituisce la risposta al danno vascolare. Un bilancio dinamico tra coagulazione e fibrinolisi regolano l'emostasi. Inoltre meccanismi di riflesso neuronale e la secrezione di fattori vasocostrittori mediano la vasocostrizione nel sito interessato riducendo il sanguinamento. Tuttavia ciò dura per pochi minuti perché ipossia ed acidosi causano un rilassamento passivo della tonaca muscolare dei vasi con ripresa del sanguinamento. Insieme con gli eventi emostatici, viene attivata la cascata coagulativa. Quando il sangue fluisce nel sito della ferita, i componenti del sangue e le piastrine entrano in contatto con il collagene e gli altri componenti della matrice

extracellulare. Ciò porta al rilascio di fattori coagulativi che formano il tappo piastrinico costituito da un intreccio di elementi della matrice extracellulare (fibrina, fibronectina, vitronectina, trombospondina) e da elementi del plasma e piastrine che vi rimangono intrappolate. Il tappo piastrinico non svolge solo un ruolo emostatico ma fornisce una matrice provvisoria per la migrazione cellulare nella fase successiva e come riserva di fattori della crescita richiesti durante il processo di guarigione (Monroe *et al.*, 2012).

Il *sistema della coagulazione* è costituito da due vie, estrinseca ed intrinseca, che si uniscono in corrispondenza dell'attivazione del fattore X e culminano con l'attivazione della trombina che taglia proteoliticamente il fibrinogeno in fibrina, la componente principale del tappo piastrinico.

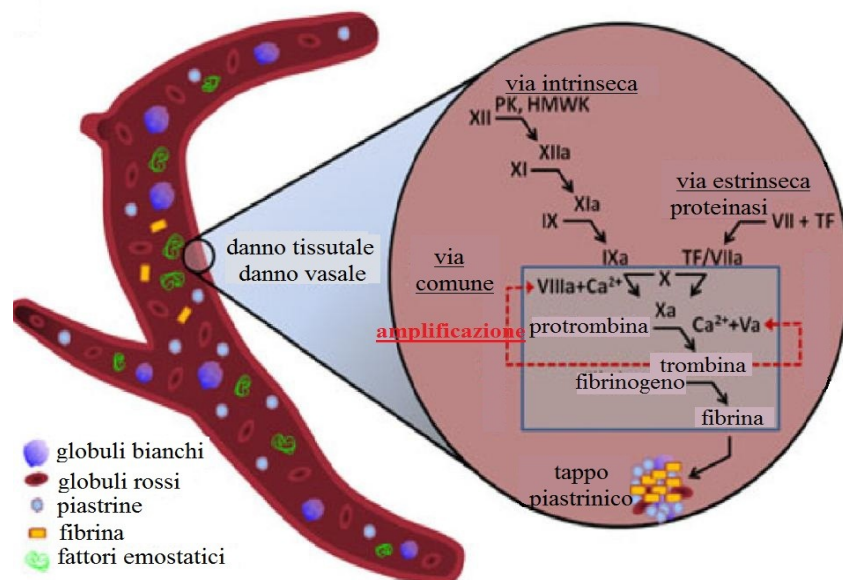


Fig. 3: cascata coagulativa. (Figura modificata tratta da Oikonomopoulou *et al.*, 2012).

La *via estrinseca* è attivata da fattori prodotti dai tessuti danneggiati che attivano il fattore VII. La *via intrinseca* è attivata da fattori presenti nel sangue. Tale processo comincia con l'attivazione del fattore XII o fattore di Hageman, una proteina del fegato che circola nel sangue in forma inattiva finché non entra in contatto con il collagene, la membrana basale o le piastrine attivate, tutti fenomeni legati al danno tissutale. Il fattore XII si scinde nel

fattore XIIa che attiva la cascata della coagulazione: la protrombina viene convertita in trombina, capace di tagliare il fibrinogeno solubile circolante in fibrina insolubile che si aggrega in formazioni fibrose che vengono stabilizzate da legami crociati formando il coagulo. Da tale taglio si formano anche i fibrinopeptidi che aumentano la permeabilità vascolare e sono chemiotattici per i leucociti. Inoltre il fattore XIIa trasforma la precallieina in callicreina attiva, una proteasi che scinde la proteina plasmatica chininogeno ad alto peso molecolare in bradichinina, un peptide vasoattivo che aumenta la permeabilità vascolare oltre che causare vasodilatazione. La callicreina attiva anche il sistema fibrinolitico responsabile della degradazione del coagulo. Il plasminogeno è una proteina plasmatica che viene attivata per idrolisi a formare plasmina, una serino-proteasi, i cui substrati sono: fibrina, fibronectina, laminina, proteoglicani, tutti componenti della matrice extracellulare (ECM). Si ha così la dissoluzione del coagulo.

L'adesione piastrinica genera segnali intracellulari che portano al rilascio di trombano A_2 (TXA₂) e del fattore attivante le piastrine (PAF) e all'esposizione del recettore per il fibrinogeno. Il fibrinogeno legato alle piastrine favorisce l'aggregazione di altre piastrine. Tale aggregato viene stabilizzato grazie a fattori aggreganti quali TXA₂, PAF e trombina che stimola la degranulazione dei granuli piastrinici citoplasmatici pieni di fattori di crescita e citochine come il fattore di crescita derivante dalle piastrine (*Platelet Derived Growth Factor* PDGF), il fattore trasformante beta (*Transforming Growth Factor β* TGF- β), il fattore della crescita epidermica (*Epidermal Growth Factor* EGF) e il fattore della crescita insulino simile (*Insuline like Growth Factor* IGF). Queste molecole promuovono il processo di guarigione delle ferite attivando e attraendo neutrofili, macrofagi, cellule endoteliali e fibroblasti. Le piastrine inoltre contengono ammine vasoattive (serotonina) che causano vasodilatazione e aumento della permeabilità vascolare promuovendo uno sversamento dei fluidi nei tessuti circostanti la lesione con edema che potenzia la fase infiammatoria. Gli eicosanoidi e gli altri prodotti del metabolismo dell'acido arachidonico sono rilasciati dalle piastrine dopo il ferimento e mediano la risposta infiammatoria (Oikonomopoulou *et al.*, 2012).

2) FASE INFIAMMATORIA

L'infiammazione è una risposta protettiva il cui obiettivo è l'eliminazione della causa iniziale del danno tissutale e l'avvio del processo riparativo.

Clinicamente i segni dell'inflammazione sono: arrossamento, tumefazione, calore, dolore, alterazione funzionale dell'area infiammata. Si tratta di manifestazioni delle alterazioni che avvengono a livello del tessuto in seguito al ferimento: vasodilatazione, aumento della permeabilità vasale con passaggio di liquidi dal letto vascolare al tessuto lesa (edema), infiltrazione leucocitaria nell'area della lesione.

La fase infiammatoria comincia con l'infiltrazione nel sito della ferita dei neutrofili, le prime cellule ad essere reclutate. I neutrofili cominciano ad essere attratti sul sito della ferita 24-36 ore dopo il ferimento da vari agenti chemioattrattori come TGF- β , prodotti di origine batterica, componenti del complemento (C3a e C5a), prostaglandine e trombossani provenienti dalla *cascata dell'acido arachidonico* (Velnar, Bailey, Smrkolj 2009). L'*acido arachidonico* (acido 5,8,11,14-eicosantetraenico) è un acido grasso polinsaturo contenente venti atomi di carbonio direttamente disponibile con la dieta, che nell'organismo viene esterificato con i fosfolipidi di membrana. Stimoli chimici (C5a, istamina, IL-1, fattori della crescita) o fisici attivano le fosfolipasi cellulari consentendo il rilascio di acido arachidonico che viene metabolizzato attraverso quattro vie ossidative:

- *La via della ciclossigenasi (COX) con formazione di prostanoidi.* L'acido arachidonico viene convertito in prostaglandina H_2 (PGH₂) attraverso la prostaglandino-sintasi di cui esistono due isoforme: COX-1 porta alla formazione di prostanoidi coinvolti nella comunicazione intercellulare; COX-2 è un enzima indotto da stimoli proinfiammatori (IL-1, PDGH) ed è espresso in alcuni tipi di cellule (fibroblasti, macrofagi, cellule endoteliali dei vasi); pertanto è coinvolto nella flogosi in quanto media vasodilatazione, edema e iperalgesia. PGH₂ può venire trasformata in trombossano A₂ (TXA₂) per azione della trombossano-sintasi.

PGD₂ e PGE₂ si formano per riarrangiamento non ossidativo di PGH₂. La prima è un antiaggregante piastrinico e rilascia la muscolatura liscia vasale; la seconda potenzia l'azione proaggregante di PGH₂ ed ha attività vasodilatatrice.

- *La via della lipossigenasi con formazione dei leucotrieni.* Gli stimoli che inducono la formazione di leucotrieni sono: prodotti di origine batterica, PAF, LTB₄, C5a, IL-8 che attivano la fosfolipasi A₂ e la 5-lipossigenasi. L'enzima 5-lipossigenasi converte l'acido arachidonico ad acido 5-idroperossieicosantetraenico (5-HPETE) che si trasforma in acido 5-idrossieicosantetraenico (5-HETE) o in leucotriene A₄ (LTA₄) a seconda che la 5-lipossigenasi si comporti da ossigenasi (nel primo caso) o da deidrasi

(nel secondo caso). LTA_4 viene sottoposto ad altre reazioni enzimatiche producendo il leucotriene B_4 (chemiotattica per neutrofili) e i leucotrieni sulfidopeptidici LTC_4 , LTD_4 , LTE_2 (che aumentano il tono della muscolatura e la permeabilità vasale).

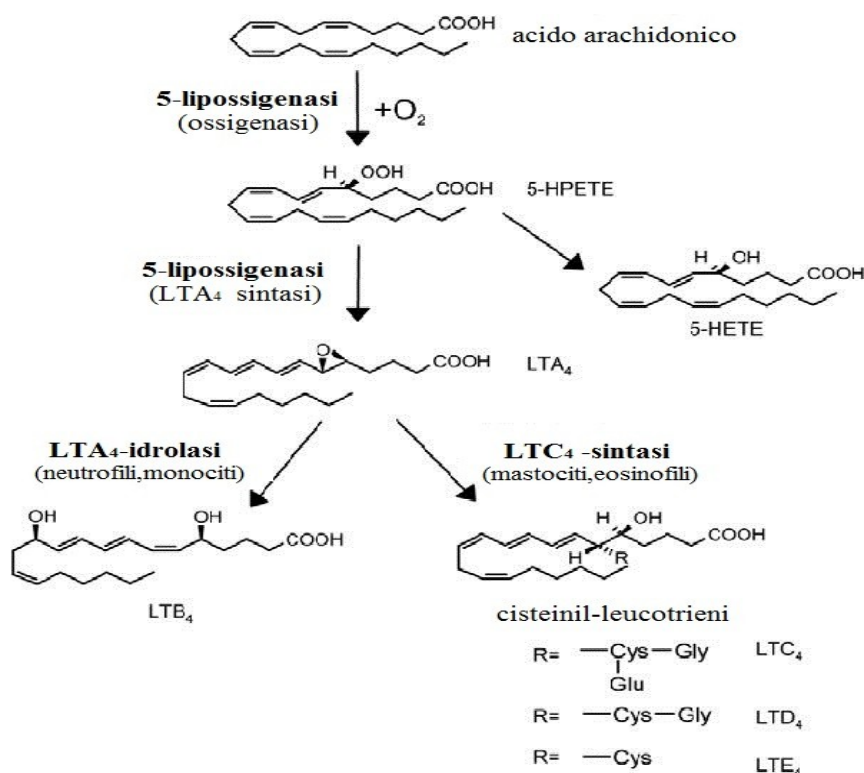


Fig. 4: conversione dell'acido arachidonico a leucotrieni da parte della 5-lipossigenasi. (Figura tratta da Clementi, Fumagalli UTET 2004 III ed.).

- La via catalizzata da enzimi *P450* con formazione di acido eposs- e idrossi-eicosantetranoico.
- La via della perossidazione lipidica non enzimatica catalizzata da specie *ROS* con formazione di isoprostani (analoghi delle prostaglandine $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGD_2 , PGE_2 come per esempio 8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$ che aumenta l'aggregazione piastrinica e il tono della muscolatura liscia vasale), isotrombossani (analoghi di TXB_2) e isoleucotrieni (Clementi, Fumagalli UTET 2004 III ed.).

I metaboliti dell'acido arachidonico danno anche il via alla cascata del complemento.

Il sistema del complemento viene attivato da eicosanoidi ed enzimi proteolitici che

compongono l'essudato infiammatorio liberando fattori chemiotattici e aumentando la permeabilità vascolare. È dunque coinvolto nella difesa dell'organismo. I componenti del complemento si trovano nel plasma in forma inattiva; C3 e C5 sono i più importanti e la loro attivazione avviene per taglio proteolitico che per C3 può avvenire secondo:

- una via classica: fissazione di C1 ad anticorpi (IgM, IgG) legati ad antigeni;
- una via alternativa: contatto con componenti della superficie microbica, immunoglobuline aggregate, polisaccaridi complessi.

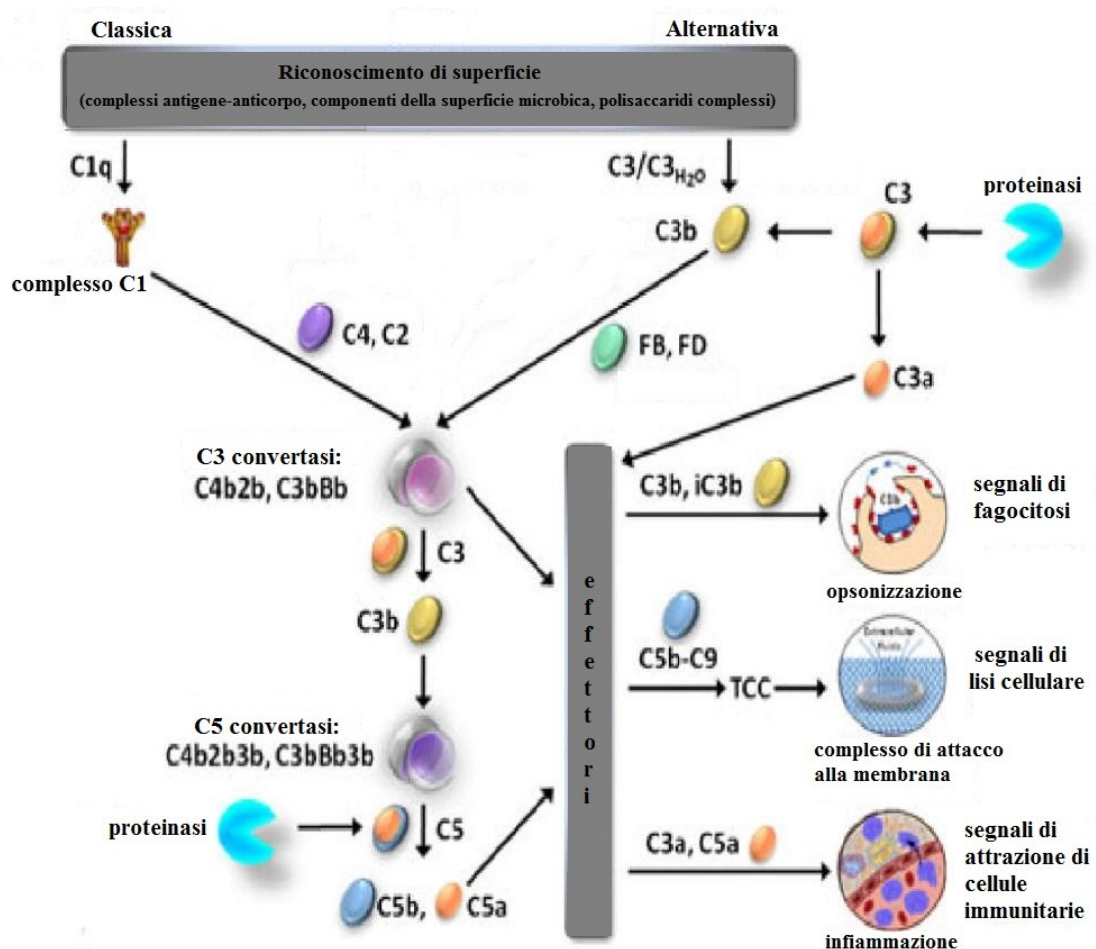


Fig. 5: cascata del complemento. (Figura modificata tratta da Oikonomopoulou *et al.*, 2012).

Entrambe le vie attivano la C3 convertasi, un enzima che scinde C3 in C3a, che viene rilasciato, e C3b, che si associa ad altri frammenti provenienti dalla scissione degli altri componenti del complemento costituendo la C5 convertasi che, a sua volta, taglia C5 in

due frammenti. C5a assembla il complesso di attacco alla membrana (MAC) che, associandosi alle membrane lipidiche dei microrganismi, ne causa la lisi. C5a attiva anche la via della lipossigenasi nei neutrofili e nei monociti causando un ulteriore rilascio dei mediatori dell'infiammazione. I frammenti C3b e C3bi, fissandosi alla parete batterica, ne favoriscono la fagocitosi ad opera di neutrofili e macrofagi. Inoltre C3a, C5a e l'anafilattossina C4a causano un aumento della permeabilità vascolare e vasodilatazione perché inducono il rilascio di istamina dai mastociti (Oikonomopoulou *et al.*, 2012).

I neutrofili, attratti sul sito della ferita da vari agenti chemioattrattori, migrano al di fuori dei vasi verso il tessuto danneggiato, un processo noto come *diapedesi*. I neutrofili aderiscono alle cellule endoteliali a livello dei capillari che circondano la ferita e rotolano lungo la superficie dell'endotelio sottraendosi al flusso sanguigno. Tale fenomeno è mediato dall'interazione tra mucine e selectine.

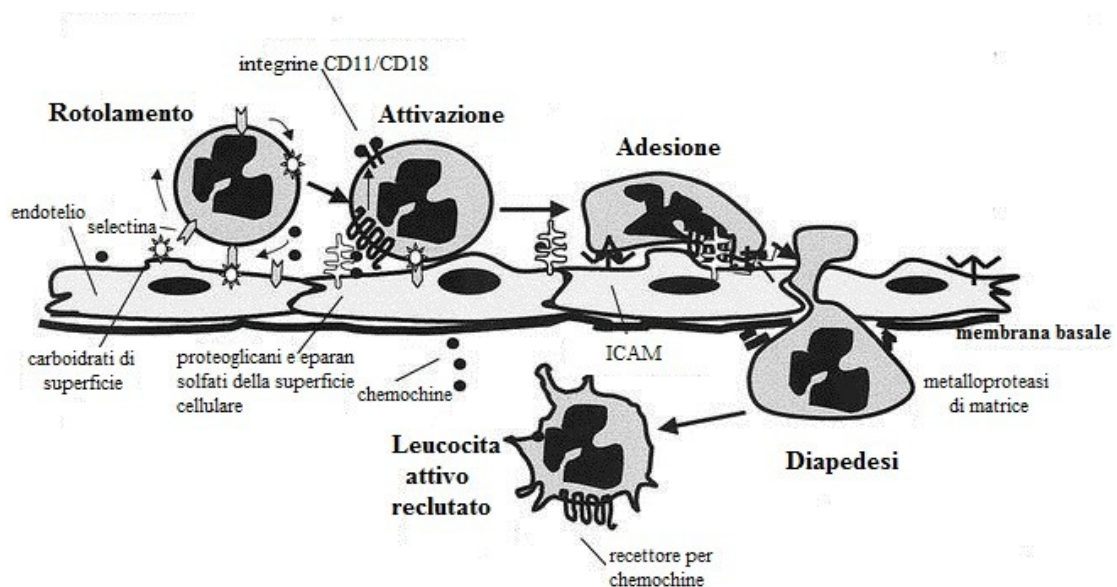


Fig. 6: rappresentazione delle varie fasi del processo di migrazione dei leucotrieni da un vaso sanguigno verso i tessuti circostanti. (Figura modificata tratta da Björn Petri, M. Gabriele Bixel, 2006)

Le *selectine* sono espresse costitutivamente sulla superficie del leucocita (L-selectine) e, in seguito a stimolazione da parte di trombina, istamina, specie reattive dell'ossigeno (ROS), IL-1 e altre citochine, vengono espresse anche sulle cellule endoteliali (E-selectine, P-selectine). Le *mucine* sono presenti sia sulla superficie del leucocita (PSGL-1), sia sulle

cellule endoteliali (GlyCam, MadCam). L'interazione selectina-mucina mantiene il leucocita in contatto dinamico con la superficie dell'endotelio. La salda adesione dei leucociti all'endotelio è invece mediata da integrine espresse sui leucociti che interagiscono con i loro ligandi sull'endotelio. Le integrine normalmente si trovano in uno stato a bassa affinità. L'aumento dell'affinità avviene ad opera di chemochine secrete da macrofagi e leucociti durante il processo infiammatorio che si legano ai proteoglicani dell'endotelio attivando le integrine consentendo l'interazione con i ligandi VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) e ICAM-1/2 (*Intercellular Adhesion Molecule-1/2*) espresse sulla superficie delle cellule endoteliali consentendo un'adesione stabile dei neutrofili all'endotelio. Le cellule smettono così di rotolare e migrano fuori dal capillare con un processo detto diapedesi. I leucociti si muovono ora tra le cellule endoteliali sotto l'azione di un gradiente chemiotattico. Tale passaggio avviene attraverso le giunzioni intercellulari grazie alle interazioni tra ICAM-1/integrine e molecole di adesione omofile PECAM-1 (*Platelet endothelial cell-adhesion molecule*) espresse sulla superficie dei leucociti e nelle giunzioni intercellulari dell'endotelio. Usciti dai vasi, i leucociti migrano nel tessuto seguendo un gradiente chimico, un processo noto come chemiotassi. I fattori chemiotattici possono essere: prodotti di origine batterica, componenti del sistema del complemento (C5a), prodotti della via della lipossigenasi (LTB₄), citochine e chemochine (IL-8). Il movimento della cellula avviene grazie al ciclico assemblamento e disassemblamento dei filamenti di actina e miosina. L'actina si polimerizza nel margine anteriore della cellula formando delle estroflessioni citoplasmatiche dette lamellipodi, mentre dalla parte opposta del margine in avanzamento si ha la depolimerizzazione dei filamenti di actina e miosina. La fuoriuscita dei neutrofili dai vasi consente loro di raggiungere il sito della lesione e fagocitare i microrganismi patogeni e le strutture tissutali danneggiate. Una volta terminata la loro funzione, i neutrofili vengono eliminati per fagocitosi dai macrofagi (Petri *et al.*, 2006).

3) FASE INFIAMMATORIA TARDIVA

Dopo 48-72 h dal ferimento compaiono i macrofagi sul sito della ferita per proseguire il processo di fagocitosi. Queste cellule in origine erano monociti del sangue prodotti dal midollo osseo. Dal circolo i monociti migrano nei tessuti e si trasformano in macrofagi. I macrofagi vengono attivati (con aumento delle loro dimensioni e del loro contenuto di

enzimi lisosomiali) da citochine ($\text{IFN}\gamma$), tossine batteriche e proteine dell'ECM e sono attratti nel sito della ferita da agenti chemiotattici come fattori di coagulazione, componenti del complemento (C5a), citochine (PDGF, $\text{TGF-}\beta$), chemochine, LTB_4 e prodotti di degradazione del collagene. A loro volta i macrofagi liberano altri mediatori dell'inflammation ($\text{TGF-}\beta$, $\text{TGF-}\alpha$, FGF, collagenasi) attivando cheratinociti, fibroblasti e cellule endoteliali. Le ultime cellule che entrano nel sito della ferita sono i linfociti, attratti dopo 72 ore dal ferimento da IL-1, componenti del complemento, IgG. Dunque, oltre che svolgere funzione di difesa, le cellule infiammatorie sono anche una importante fonte di fattori della crescita e citochine che danno il via alla fase proliferativa del processo di guarigione (Velnar, Bailey, Smrkolj, 2009).

4) FASE PROLIFERATIVA

Comincia a tre giorni dal ferimento e dura per le successive due settimane. È caratterizzata dalla migrazione di fibroblasti e dalla deposizione della nuova matrice extracellulare che va a sostituire quella provvisoria composta da fibrina e fibronectina. Si forma così un nuovo tessuto detto tessuto granuloso caratterizzato dalla massiccia presenza di capillari. In questa fase si osservano diversi processi: migrazione di fibroblasti, sintesi di collagene, angiogenesi e formazione del tessuto di granulazione, riepitelizzazione.

Migrazione di fibroblasti.

I fibroblasti dei tessuti circostanti sono stimolati a proliferare nei primi tre giorni successivi alla lesione per poi migrare verso la ferita attratti da $\text{TGF-}\beta$ e PDGF. Una volta arrivati nel sito della ferita, proliferano e producono proteine di matrice (fibronectina, proteoglicani e protocollagene di tipo 1 e 3). Dopo una settimana si è accumulata abbondante matrice extracellulare e i fibroblasti diventano miofibroblasti cioè cellule che mediano la contrazione della ferita, evento importante nella riparazione dei tessuti. I fibroblasti non più necessari vengono eliminati per apoptosi.

Sintesi di collagene

Il collagene sintetizzato dai fibroblasti gioca un ruolo chiave specialmente nella fase proliferativa e di rimodellamento.

La *matrice extracellulare* (ECM) adempie a diverse funzioni: garantisce il turgore dei

tessuti molli, fornisce rigidità ai tessuti scheletrici, rappresenta un serbatoio di fattori di crescita per la proliferazione cellulare, fornisce un supporto su cui le cellule possono aderire, migrare e proliferare. L'ECM si compone di due strutture: la matrice interstiziale (che si trova tra le cellule epiteliali, endoteliali, muscolari lisce e nel tessuto connettivo) e la membrana basale (che si trova associata alle superfici cellulari). L'ECM è costituita da: proteine fibrose strutturali (collagene, elastina), glicoproteine adesive (fibronectina, laminina), gel costituito da proteoglicani e ialuronano.

Il *collagene* fornisce l'intelaiatura extracellulare e garantisce la resistenza alla tensione. È costituito da una tripla elica di catene polipeptidiche α . Si classifica in: collagene fibrillare (collagene di tipo I, II, III) presente nella matrice interstiziale; collagene non fibrillare (collagene di tipo IV, V, VI) presente nella membrana basale. La pelle integra contiene l'80% di collagene di tipo I e il 25% di collagene di tipo III, mentre nei tessuti danneggiati il tessuto granuloso contiene il 40% di collagene di tipo III. Le *fibre elastiche* conferiscono ai tessuti la capacità di ripristino di forma e dimensione del tessuto iniziale. Sono costituite da un nucleo centrale di elastina circondato da una rete periferica di fibrillina, una glicoproteina. La *fibronectina* è una proteina adesiva che media l'adesione delle cellule alla matrice. Viene prodotta da fibroblasti, monociti, cellule endoteliali. La fibronectina è anche coinvolta nei processi di adesione e migrazione delle cellule. La *laminina* è la glicoproteina più abbondante della membrana basale; lega componenti dell'ECM fra loro e con le cellule. I *proteoglicani* sono proteine costituite da un "core" legato a glicosamminoglicani. Regolano il diametro e la struttura delle fibre di collagene. La componente dell'ECM *ialuronano* è costituita dalla ripetizione di una unità di disaccaride che lega acqua formando un gel che conferisce turgore al tessuto connettivo e resistenza alla compressione.

Questa varietà di proteine ed altre molecole dell'ECM nel tessuto connettivo del derma contribuisce a mantenere l'integrità e la complessa struttura della pelle.

Angiogenesi e formazione del tessuto di granulazione

La formazione di nuovi vasi sanguigni a partire da altri già esistenti (processo di angiogenesi) è critica nei processi di riparazione. Numerosi fattori angiogenici sono secreti durante la fase emostatica e la fase infiammatoria: fattore della crescita dei fibroblasti (*Fibroblast Growth Factor*, FGF), fattore della crescita dell'endotelio vascolare (*Vascular*

Endothelial Growth Factor, VEGF), PDGF, TGF- α e TGF- β . La formazione di un nuovo vaso passa attraverso diversi stadi caratterizzati da modifiche dell'endotelio e dell'ECM: degradazione proteolitica della membrana basale del vaso originario per permettere la gemmazione del nuovo capillare, migrazione delle cellule endoteliali che proliferano e maturano formando il nuovo vaso. Macrofagi, fibroblasti, matrice di collagene, fibrinogeno, fibronectina, ialuronano e nuovi vasi sanguigni costituiscono il tessuto di granulazione che rimpiazza la matrice provvisoria di fibrina. Con l'accumulo di collagene, la densità dei nuovi vasi sanguigni diminuisce e il tessuto granuloso gradualmente matura e forma una cicatrice.

Riepitelizzazione.

La migrazione delle cellule epiteliali comincia poche ore dopo il ferimento. Un singolo strato di cellule si forma al di sopra della lesione, evidenziando un notevole aumento dell'attività mitotica delle cellule intorno ai bordi della ferita. Le cellule migrano attraverso tale strato e aderiscono alla matrice sottostante. Quando le cellule epiteliali in avanzamento si incontrano, la migrazione si ferma e comincia la formazione della membrana basale (Velnar, Bailey, Smrkolj, 2009).

5) FASE DI RIMODELLAMENTO

In questa fase si ha lo sviluppo del nuovo epitelio e della formazione della cicatrice. La sintesi di nuova ECM in questa e nella precedente fase è cominciata contemporaneamente allo sviluppo del tessuto granuloso. Tale fase dura da uno a due anni o anche per un tempo superiore. La cicatrice è costituita da fibroblasti, collagene denso e tessuto elastico. Il bilancio tra sintesi e degradazione del collagene viene definito rimodellamento del tessuto connettivo. La collagenasi-1 (enzima della famiglia delle metallo-proteasi) è l'enzima principalmente responsabile del *turnover* del collagene; è espressa in cellule epiteliali, fibroblasti, cellule endoteliali, macrofagi, mentre la collagenasi-2 è presente nei neutrofili. L'espressione della collagenasi-1 si osserva nel sito della ferita già nelle prime 4 ore dal ferimento. Oltre ad avere una funzione di rimodellamento le metallo-proteasi sono coinvolte anche nei processi di migrazione cellulare, meccanismo essenziale nell'angiogenesi, nella fuoriuscita e nell'infiltrazione di cellule infiammatorie.

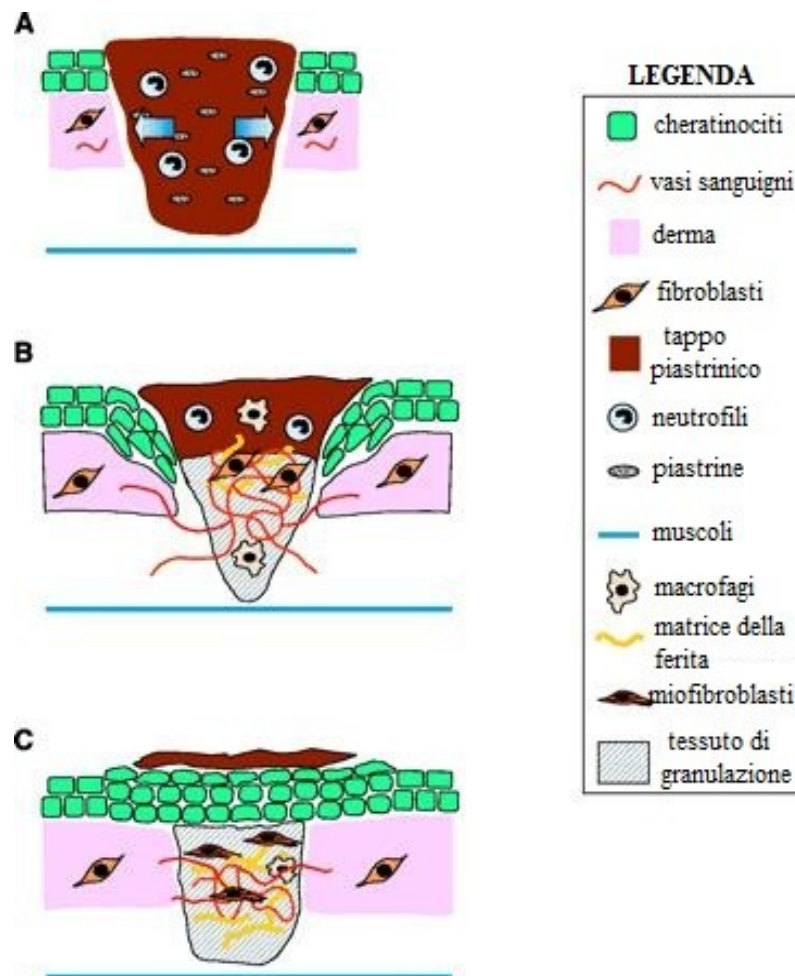


Fig. 7: Rappresentazione schematica delle varie fasi del processo di guarigione delle ferite.

A) dopo 12-24 ore dal ferimento l'area della lesione è chiusa dal tappo piastrinico e comincia l'infiltrazione dei neutrofili in tale area.

B) a 3-7 giorni dal ferimento la maggior parte dei neutrofili è andata incontro ad apoptosi. In tale fase sono invece abbondanti nel sito della lesione i macrofagi. L'area è caratterizzata dalla presenza di nuovi vasi sanguigni, dalla migrazione e proliferazione dei fibroblasti che depositano nuova ECM e dalla proliferazione dei cheratinociti lungo il margine della ferita.

C) 1-2 settimane dopo il ferimento i fibroblasti si sono trasformati in miofibroblasti che promuovono la deposizione di collagene e la contrazione della ferita. A questo punto la ferita è completamente ricoperta da nuova epidermide. (Figura modificata tratta da Werner, Krieg, Smola, 2007).

Nel processo di rimodellamento le fibre di collagene aumentano di diametro mentre ialuronano e fibronectina vengono degradati. La forza di tensione della ferita aumenta

progressivamente in parallelo con la deposizione di collagene. Le fibre di collagene possono riguadagnare circa l'80% della tensione di un tessuto integro. Il raggiungimento del grado di tensione finale dipende dalla localizzazione della ferita e dalla durata del processo riparativo, ma la tensione del tessuto originario viene riacquistata in parte e solo raramente viene ripristinata appieno.

Con il tempo si ha la maturazione della cicatrice con regressione dei capillari, diminuzione del flusso sanguigno e dell'attività metabolica del sito (Velnar, Bailey, Smrkolj, 2009).

LA FIBROSI COME ANOMALIA DEL PROCESSO DI GUARIGIONE

La cicatrice è un'area di tessuto fibroso che sostituisce la cute al termine del normale processo di guarigione delle ferite. Alterazioni di tale processo portano ad avere una insufficiente formazione della cicatrice con apertura e ulcerazione della stessa, non guarigione e cronicizzazione della ferita o, al contrario, il processo di guarigione può terminare con una esuberante produzione di tessuto connettivo.

La fibrosi della pelle è caratterizzata da un eccessivo accumulo di matrice extracellulare con alterazione della normale architettura tessutale. Un'alterazione dell'equilibrio tra produzione e degradazione dei componenti del tessuto connettivo determina la patogenesi del processo fibrotico caratterizzato da un aumento del numero di cellule del tessuto connettivo (fibroblasti, cellule connettivali, adipociti) e di costituenti della matrice extracellulare (collagene, glicoproteine, proteoglicani). Altro meccanismo implicato nella patogenesi della fibrosi è legato al persistere del danno e dunque alla continua risposta riparativa: il tessuto in necrosi viene sostituito progressivamente da nuovo tessuto connettivo (Qin Hu *et al.*, 2009).

Cicatrici ipertrofiche, cheloidi e sclerosi dermica sistemica sono esempi di fibrosi della pelle. Le *cicatrici ipertrofiche* sono una anomala guarigione delle ferite spesso associate a danni di natura termica; hanno l'aspetto di rigonfiamenti rossastri e fibrosi che rimangono entro il margine della ferita e tendono a regredire col tempo (Penn, Grobbelaar, *et al.*, 2012). *Singer* e *Clark* hanno dimostrato che le cicatrici ipertrofiche sono causate dalla continua attivazione della fase proliferativa del normale processo di guarigione con eccessiva deposizione di collagene (Singer, Clark, 1999). *Wang* ha poi notato che i

fibroblasti delle cicatrici ipertrofiche producono molto TGF- β 1 suggerendo che l'iperproduzione di TGF- β 1 e un'espressione prolungata di recettori per TGF- β 1 rispetto alla pelle normale siano i responsabili della formazione di queste fibrosi della pelle (Wang *et al.*, 2000; Schmid, Itin *et al.*, 1998).

I *cheloidi* sono cicatrici esuberanti risultato di un eccesso di tessuto di granulazione nel sito della ferita. Sono delle masse simil tumorali fibrose che vanno dal rosa al marrone. A differenza delle cicatrici ipertrofiche, i cheloidi progrediscono in una larga massa che eccede dal margine della ferita e non regrediscono spontaneamente (Latha Satish, Sandeep Kathju, 2010).

La *sclerosi dermica sistemica* è una alterazione del tessuto connettivo che colpisce la pelle ma anche organi interni (reni, polmoni, cuore). È caratterizzata da eccessiva fibrosi della cute e degli organi interni, da anomalie del microcircolo e da fenomeni autoimmuni. Questi tre aspetti della patologia coesistono anche se il più evidente è la fibrosi che si presenta come indurimento e ispessimento della cute per eccessiva deposizione di collagene. È oggi chiaro che l'infiammazione gioca un ruolo chiave nel mediare la patogenesi del processo che porta alla sclerosi sistemica. Studi recenti hanno evidenziato che il *pathway* della citochina interleuchina 6 (IL-6) guida l'infiammazione locale inducendo la risposta fibrotica. Infatti la concentrazione di IL-6 aumenta nel siero di pazienti con sclerosi sistemica; infatti i fibroblasti isolati da soggetti malati mostrano in vitro una eccessiva produzione di IL-6 e di collagene e presentano una elevata attività di trascrizione di geni codificanti per il collagene (Barnes, Anderson, 2011).

FIBROBLASTI E FIBROSI

I fibroblasti sono cellule ubiquitarie con funzione strutturale (producono ECM) e partecipano attivamente alla risposta immunitaria influenzando il passaggio da infiammazione acuta a cronica (Kalluri, Zeisberb, 2006).

I fibroblasti hanno tre differenti origini cellulari. Possono derivare da: (a) precursori del mesenchima primario, (b) precursori locali di transizione epiteliale-mesenchimale (EMT), (c) cellule precursori circolanti nel sangue (fibrociti) che originano nel midollo osseo. I fibroblasti derivano principalmente da cellule mesenchimali primarie (Postlethwaite *et al.*, 2004). I fibroblasti, oltre al loro ruolo primario nella sintesi di nuova ECM e del suo

rimodellamento, sono anche in grado di regolare lo sviluppo, la differenziazione e la riparazione dei tessuti epiteliali ed endoteliali attraverso la produzione o la risposta a fattori della crescita. Inoltre attraverso la produzione di citochine e chemochine i fibroblasti svolgono un ruolo chiave nello sviluppo e nell'organizzazione della risposta infiammatoria (Parsonage *et al.*, 2005) in quanto l'attivazione dei fibroblasti porta alla produzione di citochine, chemochine e prostanoidi (Smith *et al.*, 1997). Essi regolano anche le cellule ematopoietiche del tessuto danneggiato attraverso l'interazione del ligando del CD40 col suo recettore che attiva le proteine della famiglia recettoriale NFκB (*Nuclear Factor kappa B*) causando un aumento della sintesi di IL-6, IL-8, COX2 e ialuronano. Proprio il comportamento anomalo dei fibroblasti, attribuito in numerosi studi ad alterazioni dei pathways di IL-6 e TGF-β1, è responsabile dei processi fibrotici (Zhang *et al.*, 1998; Pap *et al.*, 2000).

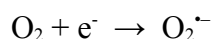
SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO NEL PROCESSO DI GUARIGIONE DELLE FERITE

Numerosi aspetti del processo di guarigione delle ferite sono sotto il controllo delle specie reattive dell'ossigeno (ROS).

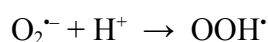
Sperimentalmente è stato osservato che l'essudato della ferita contiene concentrazione micromolari di perossido di idrogeno (H₂O₂) . Tali livelli sono significativamente elevati nella fase infiammatoria rispetto alla fase postinfiammatoria (Jiri Kanta, 2011).

Tra le varie ROS ricordiamo: il radicale anionico superossido (O₂^{•-}), il perossido di idrogeno (H₂O₂) e il radicale idrossile (OH[•]).

Il radicale anionico superossido viene generato per riduzione di ossigeno molecolare.

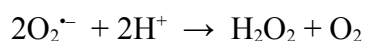


O₂^{•-} è in grado di accettare un protone per formare il radicale idroperossile che è un ossidante più forte di O₂^{•-}

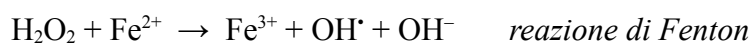


O₂^{•-} dà reazione di disproporzione nella quale una molecola di radicale anionico superossido dona un elettrone a un altro radicale anionico superossido formando perossido

di idrogeno. Tale reazione viene promossa dalla superossido dismutasi (SOD).



Il radicale anionico superossido può anche donare un elettrone al ferro ferrico (Fe^{3+}) per formare ferro ferroso (Fe^{2+}) che riduce a sua volta H_2O_2 causando la rottura omolitica del legame ossigeno-ossigeno di $\text{O}_2^{\cdot-}$ per formare il radicale idrossile nella reazione di Fenton.



La maggior parte delle ROS è rilasciata da neutrofili e macrofagi durante la fase infiammatoria. Le ROS proteggono da infezioni fungine e batteriche; tale effetto batteriostatico è stato osservato per concentrazioni tra 25-50 μM , mentre l'azione battericida è stata rilevata per concentrazioni superiori a 500 μM . L'acido ipocloroso (ottenuto per ossidazione dell'anione cloruro a ipoclorito da parte del perossido di idrogeno $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{HClO} + \text{H}_2\text{O}$) ha un potenziale di ossidazione maggiore di H_2O_2 e inibisce la crescita batterica del 50% a 20 μM e del 100% a 50 μM (Jiří, Kanta, 2011). Nel sito della ferita le specie reattive dell'ossigeno non solo disinfettano ma contribuiscono direttamente al processo di guarigione. Neutrofili e macrofagi rilasciano ROS nel sito della ferita, ROS che derivano da attività respiratoria dei fagociti tramite:

- enzimi della famiglia NADPH ossidasi fagocitaria (phox)
- enzimi della famiglia NADPH ossidasi non fagocitaria (Nox) espresse in cellule come fibroblasti, cellule endoteliali, cheratinociti.

I macrofagi migrati nel sito della lesione rilasciano una ampia quantità di radicali superossido prodotti dalla NADPH ossidasi. Questo complesso enzimatico è composto da proteine localizzate nelle membrane dei fagosomi di fagociti. Alcuni componenti del complesso enzimatico si trovano nel citosol ed in seguito a stimolazione si localizzano sulle membrane. Il complesso enzimatico della NADPH ossidasi trasferisce elettroni dal NADPH all'ossigeno molecolare producendo radicale superossido che viene convertito in perossido di idrogeno dagli enzimi SOD. Anche le cellule non fagocitarie come i fibroblasti contengono il complesso della NADPH ossidasi o altri sistemi enzimatici che generano superossido. I fibroblasti producono ROS quando sono stimolati da citochine infiammatorie: IL-1, $\text{TNF}\alpha$ o dai fattori della crescita EGF e PDGF.

Se la fase infiammatoria non si risolve e la concentrazione delle ROS eccede rispetto alla capacità antiossidante della cellula, si ha la condizione di stress ossidativo che è uno tra i più importanti fattori che limitano il processo di guarigione. Lo stress ossidativo mediato

dai radicali ROS (anione superossido, radicale idrossile) e dalle ROS non radicaliche (perossido di idrogeno) può inibire la migrazione e la proliferazione cellulare causando danno tissutale e perpetrazione dell'inflammatione.

Ci sono due tipi di sistema di difesa che le cellule hanno sviluppato per detossificare le ROS:

- sistema non enzimatico costituito da molecole antiossidanti come: vitamina C, vitamina E, β -carotene, glutathione, coenzima Q, bilirubina e urato;
- sistema enzimatico che comprende tre tipi di superossido dismutasi (citoplasmico, mitocondriale, extracellulare), glutathione perossidasi e catalasi.

Elevati livelli di SOD sono stati trovati nelle fasi iniziali del processo riparativo delle ferite. Il perossido di idrogeno prodotto da SOD viene poi decomposto da catalasi e viene usato per ossidare il substrato adatto come il glutathione, in una reazione catalizzata dalla glutathione perossidasi (Chandran Sen, Sashwati Roy, 2008).

CITOCHINE PROINFIAMMATORIE

La risposta infiammatoria è indotta e controllata da un gran numero di mediatori citochinici che agiscono in un complesso *network* in cui i diversi mediatori si influenzano reciprocamente. Le citochine sono glicoproteine prodotte da molti tipi di cellule (linfociti, macrofagi, cellule endoteliali). Hanno effetto su un ampio numero di cellule e tessuti e agiscono prevalentemente in modo autocrino-paracrino. Le citochine regolano la chemioattrazione, l'attivazione e la proliferazione dei leucociti.

Le citochine vengono classificate in:

- **Citochine infiammatorie primarie:** sono molecole prodotte e rilasciate all'inizio del processo infiammatorio e sono in grado di mettere in movimento l'intera cascata di mediatori dell'inflammatione. Tali citochine includono: IL-1, IL-6, TNF α . Sono in grado di stimolare la proliferazione di cheratinociti e fibroblasti, di promuovere la sintesi o la degradazione delle proteine dell'ECM, di promuovere la chemiotassi dei fibroblasti e di regolare la risposta immunitaria.
- **Citochine infiammatorie secondarie:** sono rappresentate dalle chemochine, molecole normalmente assenti in condizioni fisiologiche che vengono indotte da citochine infiammatorie primarie. Sono responsabili del reclutamento di leucociti e

linfociti e contribuiscono al processo di riepitelizzazione, rimodellamento tissutale e angiogenesi (Werner, Grose, 2003).

Interleuchina-1 (IL-1)

La famiglia di IL-1 è costituita da due molecole che agiscono come agonisti del loro recettore, IL-1 α e IL-1 β , e da una molecola che agisce come antagonista (IL-1ra). IL-1 stimola la proliferazione di fibroblasti, cellule endoteliali e la trascrizione di geni codificati per il collagene. La produzione di IL-1 viene indotta da diversi agenti: endotossine batteriche, citochine (IL-4, IL-13, TGF- β , IL-1). IL-1 stimola la sintesi di altre citochine: TNF α , IL-6, GM-CSF.

IL-1 è il principale mediatore della risposta immunitaria innata. La potente attività proinfiammatoria di IL-1 α e di IL-1 β porta agli effetti biologici sotto elencati:

- effetti locali: angiogenesi, fibrosi, infiltrazione dei neutrofili, induzione di chemochine;
- effetti immunologici: stimolazione di linfociti T e B;
- effetti infiammatori: aumento delle molecole adesive sull'endotelio, promozione del rilascio di prodotti del metabolismo dell'acido arachidonico (prostanoidi, eicosanoidi).

I recettori per IL-1, *Toll-Like Receptor* (TLR), sono espressi in varie cellule quali: macrofagi, neutrofili, cellule endoteliali della cute, linfociti T e B. I TLR sono recettori costituiti da un singolo dominio transmembranale e da un dominio intracitoplasmatico TIR (*Toll-like/IL-1 Receptor*). L'attivazione del segnale di IL-1 richiede, oltre ad una prima catena recettoriale in grado di interagire con il ligando, una catena accessoria (AcP) non coinvolta nel legame con il recettore ma necessaria per il reclutamento di trasduttori del segnale.

Dopo il legame del ligando IL-1 e la formazione del complesso recettoriale eterodimerico, la conformazione di TIR si modifica consentendo l'interazione con la proteina adattatrice MyD88 che contiene un dominio di morte che le consente di reclutare le chinasi IRAK (*IL-1 Receptor Activated Kinase*).

La proteina adattatrice Tollip (*Toll interacting protein*) si trova associata ad IRAK-1 in cellule non stimulate. In seguito a stimolazione da parte di IL-1, il complesso Tollip/IRAK-

IL-1 trasloca sul recettore interagendo con il dominio di morte di MyD88. Rapidamente IRAK-1 si autofosforila determinando il suo distacco dal complesso recettoriale e la sua migrazione nel citoplasma. Nel citoplasma le IRAK interagiscono con l'adattatore TRAF6 (*TNF Receptor Associated Factor 6*) e con TAB2 (*TGF- β activated kinase/MAP3K7 binding protein 2*), proteina adattatrice per TAK1 (*TGF- β Activated Kinase 1*). TAK1 è una MAPKKK che fosforila IKK β (*I κ B-kinase β*) e MKK6 che attivano il pathway di NF κ B (*Nuclear Factor kappa B*) e i pathway delle MAPK p38 (*Mitogen Activated Protein Kinase p38*) e JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*).

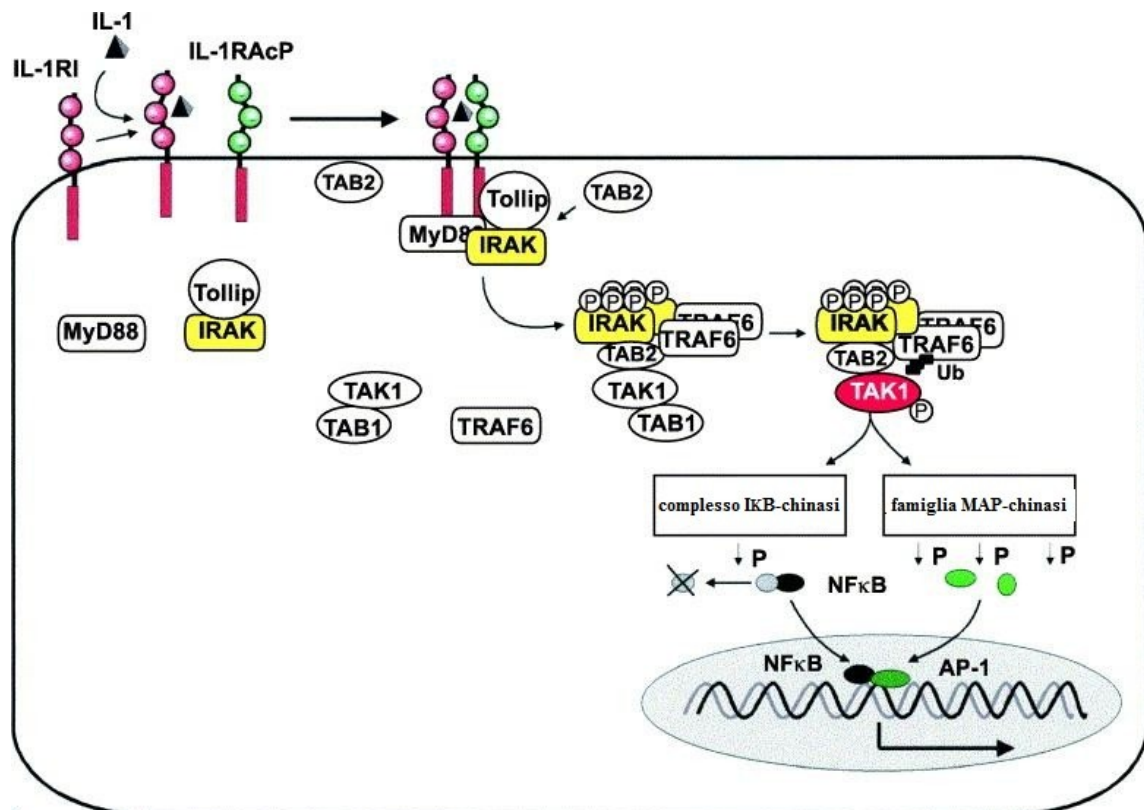


Fig. 8: schematizzazione del pathway del recettore TLR di IL-1. (Figura modificata tratta da Michael U. Martin, Holger, 2002).

La MAPK p38 è attivata da stress cellulari e da citochine proinfiammatorie (IL-1, TNF α , ecc.); induce l'espressione di geni codificanti per citochine e COX-2.

La MAPK JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) è attivata da *stress* cellulari, citochine e fattori della crescita e promuove l'attivazione di vari fattori di trascrizione tra cui c-Jun. Quest'ultimo fa parte del complesso di trascrizione AP-1 che stimola la trascrizione di geni

codificanti per citochine proinfiammatorie e per enzimi responsabili della degradazione dell'ECM.

Quindi l'attivazione del pathway di TLR da parte di IL-1 causa un aumento dell'espressione di geni per IL-1 stesso, IL-6, altre citochine proinfiammatorie e molecole di adesione (Rosenwasser 1998; Martin, Wesche, 2002).

Fattore di necrosi tumorale α (*Tumor necrosis factor- α* TNF α)

TNF α è prodotto da vari tipi di cellule (macrofagi in particolare) in risposta a vari stimoli proinfiammatori. Nel tessuto sede dell'infiammazione TNF α induce un quadro proinfiammatorio e protrombotico producendo chemochine, molecole di adesione e fattori tissutali con attività procoagulante. Altro bersaglio di TNF α è il tessuto connettivo nel quale promuove la deposizione di collagene.

Il recettore TLR per TNF α caratterizzato da un dominio di morte che recluta le proteine TRADD (*TNF Receptor-Associated Death Domain protein*) con attivazione dei pathways di NF κ B e delle MAPK JNK e p38, e di un profilo trascrizionale di tipo infiammatorio.

Attivazione del pathway di NF κ B: il legame di TNF α al recettore TNFR porta al reclutamento sul recettore della proteina adattatrice TRADD che serve da piattaforma per l'assemblaggio di TRAF2 (*TNF Receptor-Associated Factor 2*). A TRADD si può anche assemblare RIP (*Receptor Interacting Protein*) che è anche in grado di interagire con TRAF2. TRAF2 recluta il complesso IKK (*I- κ B Kinase*) su TNFR. Il complesso IKK è costituito da due chinasi (IKK1 e IKK2), dalla proteina regolatrice NEMO (*NF κ B Essential Modulator*) e da Hsp90 (*Heat shock protein 90*). Nello stato inattivo le proteine I- κ B (*Inhibitory counterparts of the NF κ B*) sono associate a NF κ B. TNF α induce la liberazione di NF κ B che può così traslocare dal citoplasma al nucleo per attivazione della chinasi IKK che è in grado di fosforilare ed attivare I- κ B. Anche RIP può attivare il complesso IKK tramite una via indiretta che prevede l'attivazione di MEKK3 (*Mitogen Activated protein Kinase/Erk Kinase kinase 3*). RIP attiva tramite la proteina adattatrice p62 la protein chinasi C (PKC ζ) che fosforila p65 (che si lega al DNA) e IKK con attivazione di Nf κ B.

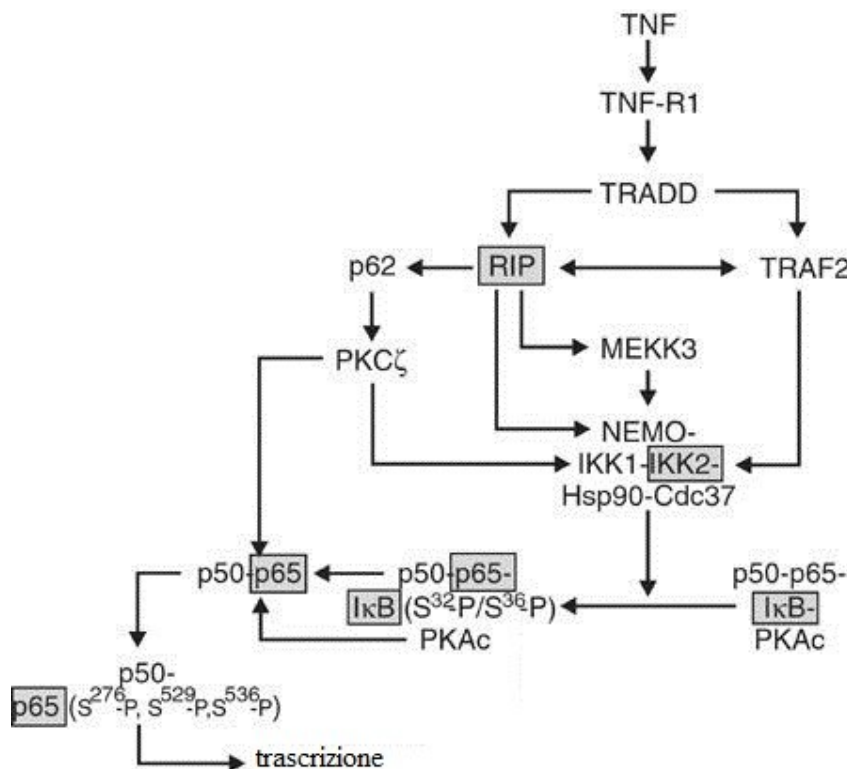


Fig. 9 : schema di attivazione di NFκB da parte del recettore per TNFα. (Figura tratta da Wajant, Pfizenmainer, Scheurich, 2003).

Attivazione delle MAPchinasi JNK e p38: TNFα induce l'attivazione del *pathway* di JNK attraverso TRAF2. TRAF2 interagisce con GCK (*Germinae Center Kinase*), una famiglia di serino/treonino chinasi che inducono l'attivazione di MEKK-1 e successivamente di MKK7 che può essere attivata anche da ASK1 (*Apoptosis Signal-regulating Kinase 1*). TNFα avvia anche la segnalazione di p38 MAPK tramite l'attivazione di RIP. p38 MAPK promuove la trascrizione di geni codificanti per IL-1 e IL-6; inoltre attiva diversi fattori di trascrizione (ATF2, CREB, ELK1). TRADD può anche reclutare un secondo adattatore FADD (*Fas-Associated Death Domain*) che attiva la caspasi-8 con avvio di un programma di morte per apoptosi.

Dunque le citochine infiammatorie primarie IL-1 e TNFα inducono localmente la produzione di molecole adesive, chemochine, fattori della crescita e mediatori solubili che amplificano il reclutamento leucocitario (Wajant, Pfizenmainer, Scheurich, 2003).

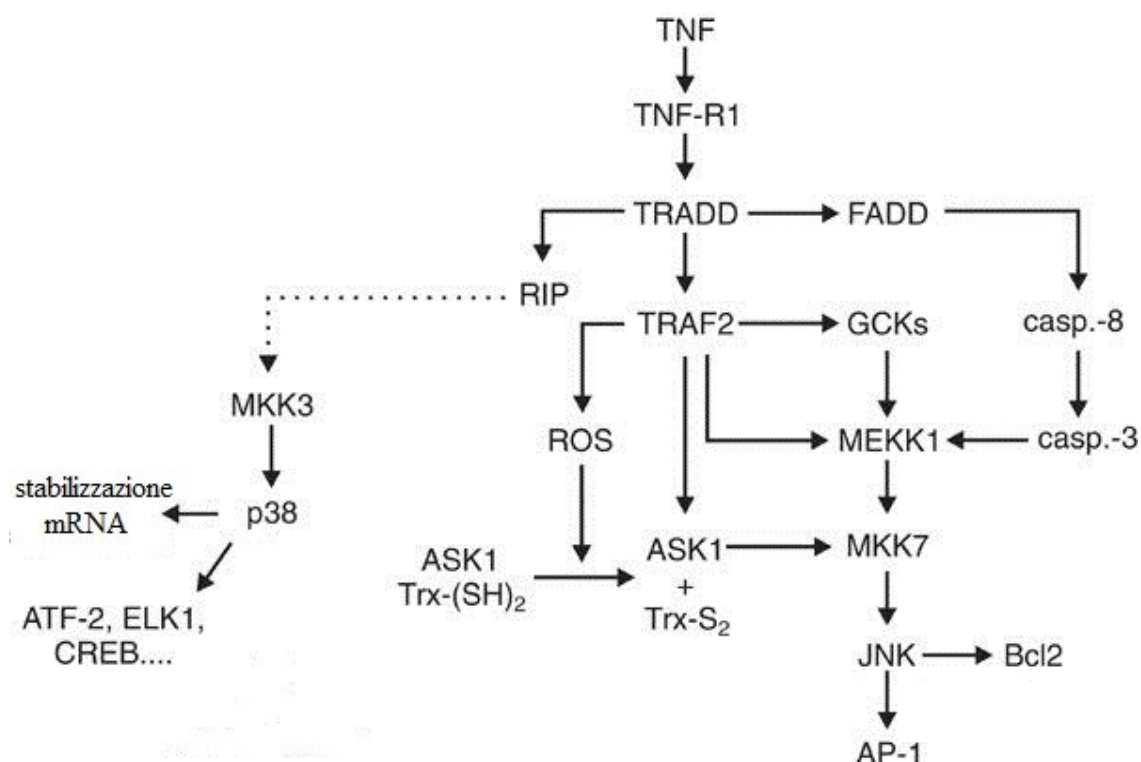


Fig.10: schema di attivazione del *pathway* di JNK e p38 MAPK da parte del recettore per TNFα. (Figura tratta da Wajant, Pfizenmainer, Scheurich, 2003).

Interleuchina-6 (IL-6)

IL-6 agisce sull'endotelio vascolare amplificando l'espressione di molecole adesive e favorendo la produzione di chemochine attive sui monociti contribuendo alla transizione da infiammazione acuta a infiammazione cronica. È una citochina prodotta principalmente dai cheratinociti dell'epidermide e in misura minore dai macrofagi e dai fibroblasti del derma. IL-6 regola il reclutamento di leucociti sul sito della ferita, induce l'espressione di citochine chemioattrattive per neutrofili e macrofagi e stimola la produzione di collagene da parte dei fibroblasti. IL-6 è anche coinvolta nel processo di angiogenesi.

Un deficit di IL-6 avrebbe quindi profondi effetti in ogni fase del processo di guarigione delle ferite.

Il recettore per IL-6 è un eterodimero che manca di attività chinastica intrinseca. Per poter

procedere alla trasmissione del segnale recluta dei trasduttori intracellulari, delle tirosinchinasi della famiglia Janus: JAK1, 2, 3. In seguito ad attivazione del recettore, JAK fosforila i propri residui tirosinici reclutando il complesso di trasduzione del segnale STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*). Le STAT sono delle proteine citoplasmatiche che trasducono i segnali di vari fattori della crescita, citochine e ormoni. Attivate dalla fosforilazione di una tirosina, dimerizzano e traslocano nel nucleo dove si legano a specifici elementi del DNA regolando così l'espressione di alcuni geni.

IL-6 induce tramite JAK2 l'attivazione di STAT3 che, a sua volta, attiva il *pathway* delle MAPK ERK (Lin, Kondo *et al.*, 2003).

Fattore trasformante β (*Transforming Growth Factor- β* TGF- β)

TGF- β è una proteina di cui esistono tre isoforme TGF- β 1, 2 e 3. Svolge un importante ruolo come modulatore della crescita, dell'infiammazione, della sintesi di ECM e dell'apoptosi.

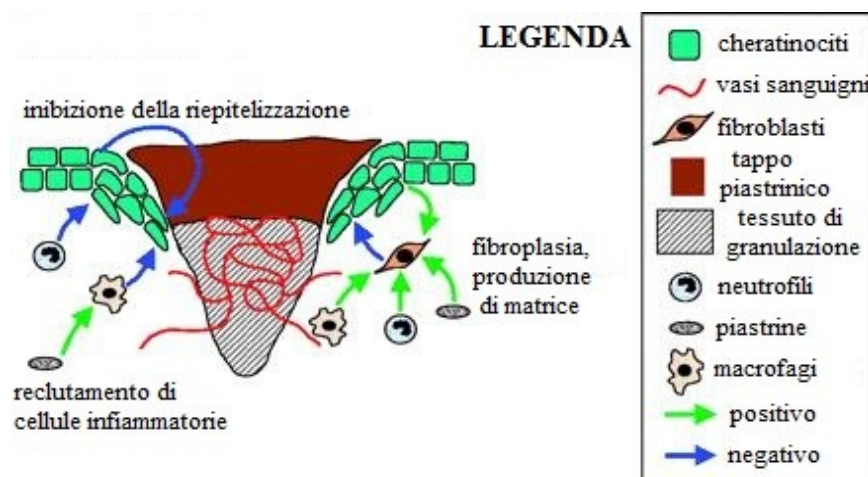


Fig. 11: funzioni di TGF- β durante il processo di guarigione delle ferite. TGF- β viene rilasciato da piastrine, leucociti, macrofagi, fibroblasti e cheratinociti promuovendo l'infiltrazione delle cellule infiammatorie, fibroplasia, deposizione di ECM e angiogenesi nel sito della ferita. TGF- β inibisce la riepitelizzazione. (Figura modificata tratta da Werner, Grose, 2003).

Dopo il ferimento TGF- β 1 viene rilasciato dalle piastrine e attira sul sito della ferita neutrofili, macrofagi e fibroblasti che liberano altro TGF- β 1. TGF- β stimola la proliferazione dei fibroblasti e la loro differenziazione a miofibroblasti, promuove la produzione di collagene, la deposizione di nuova matrice e l'angiogenesi.

La concentrazione di TGF- β è regolata dalla conversione di TGF- β latente in TGF- β attivo tramite:

- proteasi come plasmina e le metalloproteasi (MMP-2 e MMP-9)
- trombospondina-1, una proteina di matrice
- recettori integrinici di superficie
- specie reattive dell'ossigeno (ROS)

Gli effetti biologici di TGF- β sono mediati da un complesso recettoriale eteromero, una serino/treonina chinasi, che attiva una cascata di segnali intracellulari.

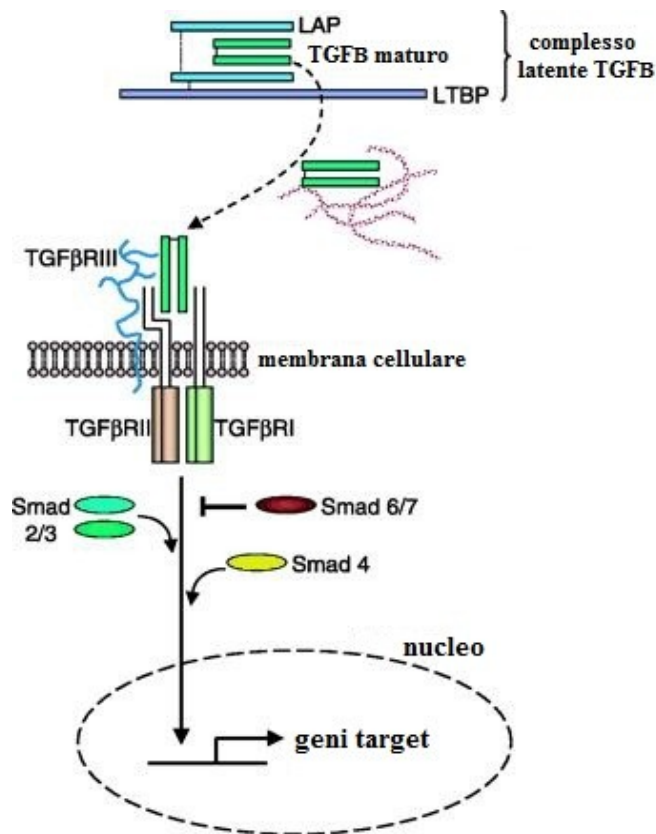


Fig. 12: attivazione delle proteine Smad da parte dei recettori TGF- β . Il TGF- β viene prodotto all'inizio come precursore inattivo che si lega a LAP (latency-associated protein). Una volta attivato, il TGF- β o viene sequestrato da proteine extracellulari (decorina, fibromodulina) o si lega al recettore TGF- β RIII attivando la trasduzione dei segnali per reclutamento di TGF- β RII che a sua volta interagisce con TGF- β RI. Segue la fosforilazione e l'attivazione delle Smad2,3 e 4. Quest'ultima trasloca nel nucleo e si lega ad altri fattori di trascrizione. (Figura modificata tratta da

Werner, Grose, 2003).

Il meccanismo di segnalazione di TGF- β comincia con il legame del ligando al rispettivo recettore di membrana. Segue la fosforilazione dei mediatori citoplasmatici della famiglia Smad (Smad3) che traslocano nel nucleo dove fungono da fattori di trascrizione (Werner, Grose, 2003).

CHEMOKINE

Le chemochine (citochine chemiotattiche) sono un sottogruppo di citochine che stimolano la chemiotassi. Questa ampia famiglia di proteine conta circa 50 membri. Le chemochine svolgono la loro funzione legandosi a recettori accoppiati a proteine G espressi sulla superficie cellulare.

MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) è una chemochina con attività chemiotattica nei confronti dei macrofagi. È coinvolta nei processi di infiammazione, di formazione del tessuto granuloso e di riepitelizzazione. MCP-1 è prodotta da cellule presenti in situ (cheratinociti del margine della ferita, cellule endoteliali) e da cellule infiammatorie (macrofagi). Anche *GRO- α (Growth-Related Oncogene- α)* regola l'infiltrazione dei macrofagi e dei neutrofili nel sito della ferita. Sia la produzione di GRO- α che di MCP-1 viene indotta dalle citochine IL-1 e TNF α .

L'*interleuchina-8 (IL-8)* viene prodotta da macrofagi e da neutrofili in seguito a stimolazione da parte delle citochine IL-1, TNF α e da prodotti batterici. Il picco della concentrazione di IL-8 nelle prime 24 ore dopo il ferimento indica che l'espressione di tale chemochina è rapida appena dopo l'evento lesivo. IL-8 è chemoattraente per i neutrofili e i cheratinociti. *IP-10 (Interferon- γ -inducible Protein-10)* è una chemochina espressa 4-7 giorni dopo il ferimento per stimolazione da parte di IFN γ . Si trova ampiamente espressa in condizioni di infiammazione cronica ed è coinvolta nel reclutamento dei linfociti (Werner, Grose, 2003).

I recettori per chemochine appartengono ai recettori a sette domini transmembranalici accoppiati a proteine G eterotrimeriche (subunità α , β , γ). Una volta attivato, il recettore innesca la cascata di trasduzione del segnale catalizzando lo scambio di GDP con GTP

sulla subunità α della proteina G con dissociazione del complesso trimerico. Le subunità α e $\beta\gamma$ attivano varie fosfolipasi e chinasi. Vengono inoltre attivati vari segnali che agiscono sulle integrine leucocitarie aumentandone l'affinità di legame per il recettore endoteliale. La subunità α a cui è legato il GTP è in grado di regolare i livelli di adenilato ciclasi, stimolare la fosfolipasi C e di regolare il fattore di scambio di nucleotidi guanilici per la GTPasi Rho (RhoGEF). La subunità $\beta\gamma$ è in grado di attivare la fosfolipasi C, la fosfatidilinositolo-3-chinasi (IP-3K), i canali ionici di K^+ e di inibire il canale del Ca^{++} .

Sistema dell'adenilato ciclasi. La proteina G_s stimola l'attività dell'adenilato ciclasi tramite la subunità α_s , mentre la proteina G_i la inibisce tramite la subunità α_i . La stimolazione dell'adenilato ciclasi porta all'aumento di AMPciclico che attiva la proteinchinasi A (PKA) che controlla diversi processi cellulari: reazioni metaboliche, attività di canali ionici, processi di secrezione e di proliferazione.

Sistema delle fosfolipasi. L'attivazione della fosfolipasi C induce l'idrolisi di un fosfolipide di membrana PIP_2 (fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato) con formazione di due secondi messaggeri: IP3 e DAG. Il DAG (diacilglicerolo) attiva la PKC che induce la liberazione di Ca^{++} da depositi intracellulari. Il DAG viene degradato da chinasi ad acido fosfatidico che viene usato per la nuova sintesi di fosfoinositoli. IP3 (inositolo-1,4,5-trifosfato) è in grado di mobilitare il Ca^{++} dai depositi intracellulari a rapido scambio.

I recettori per le chemochine attivano anche le cascate chinasiche della famiglia delle MAPK JNK, ERK1/2 e p38 che, agendo sui fattori trascrizionali delle famiglie NF κ B e AP-1, regolano la trascrizione genica.

Attivazione della cascata di ERK MAPchinasi da parte di recettori accoppiati a proteine G. L'attivazione di recettori accoppiati a proteine Gq porta a stimolazione della fosfolipasi C con formazione di inositoli e diacilglicerolo e attivazione di PKC che fosforila Raf, la prima chinasi della cascata di fosforilazione che porta al *pathway* della MAPK ERK.

Altro meccanismo di attivazione di ERK mediante GPCR coinvolge la formazione di un complesso multiproteico. Dopo il legame del ligando a GPCR si ha fosforilazione del recettore attraverso la chinasi GRK (*G protein-coupled Receptor Kinase*). A questo punto la β -arrestina si associa al recettore portando con sé le varie componenti della cascata di

attivazione di ERK (Raf, MEK, ERK). (Clementi, Fumagalli UTET 2004 III ed.).

FATTORI DELLA CRESCITA

Famiglia di fattori della crescita derivanti dai fibroblasti (FGF)

La famiglia FGF è costituita da 22 membri. La trasduzione del segnale avviene attraverso dei recettori transmembranalici ad attività tirosinchinasica. FGF stimola la proliferazione di cellule del mesoderma, ectoderma ed endoderma. Oltre a tale effetto mitogenico, FGF regola anche la migrazione e la differenziazione di varie cellule e stimola l'angiogenesi.

I fattori FGF1, FGF2, FGF5 e FGF7 sono normalmente espressi nella cute e aumentano in caso di ferite.

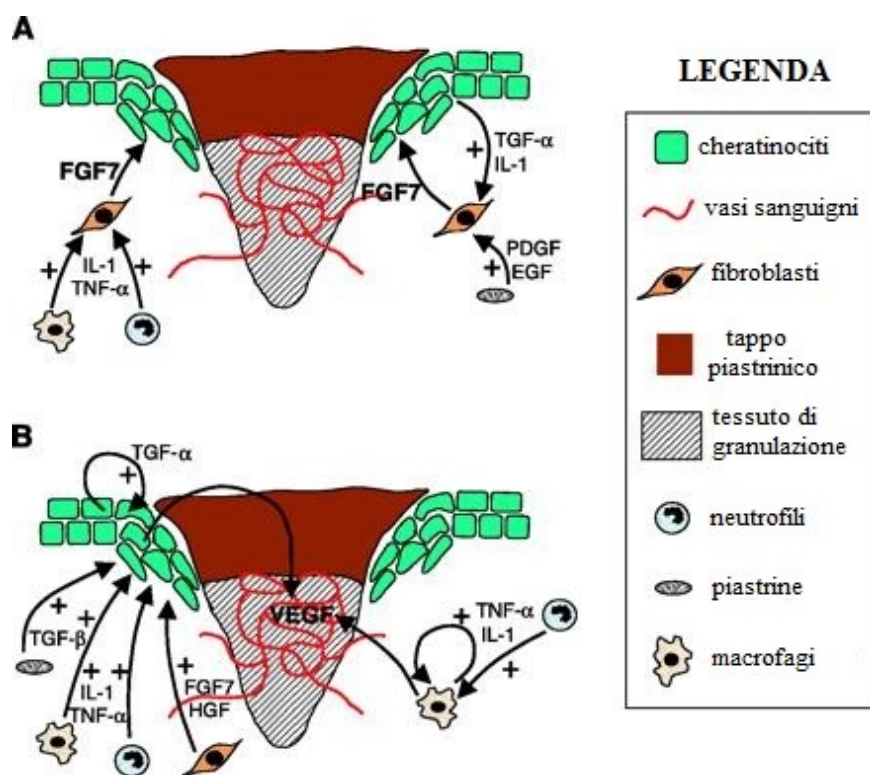


Fig. 13: fattori della crescita nel sito della ferita. A) L'emorragia locale causa lo sversamento di piastrine e il rilascio di PDGF e EGF che stimolano l'espressione di FGF7. Inoltre neutrofili e macrofagi (tramite il rilascio delle citochine IL-1 e TNF α) e i cheratinociti (per rilascio delle citochine IL-1 e TGF- α) inducono un ulteriore rilascio di FGF7.

B) L'emorragia locale causa lo sversamento di piastrine e il rilascio di TGF- β . I macrofagi rilasciano TGF- β e le citochine IL-1 e TNF α . Questi fattori stimolano l'espressione di VEGF in cheratinociti e macrofagi. Anche FGF7 e HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) promuovono il rilascio di VEGF. (Figura modificata tratta da Werner, Grose, 2003).

Famiglia di fattori della crescita derivanti da piastrine (PDGF)

I PDGF sono una famiglia di fattori omo ed eterodimerici che esercitano le loro funzioni legandosi a recettori transmembranali ad attività tirosinchinasica di transmembrana. PDGF mostra attività chemiotattica nei confronti delle cellule migranti nel sito della lesione come neutrofili, monociti e fibroblasti. Inoltre PDGF:

- stimola la proliferazione dei fibroblasti che producono nuova ECM nelle prime fasi del processo di guarigione delle ferite;
- induce l'espressione del fenotipo miofibroblasti stimolando i fibroblasti a contrarre la matrice di collagene in una fase successiva del processo di guarigione.

PDGF è ampiamente rilasciato nel sito della ferita per degranulazione delle piastrine.

Famiglia di fattori della crescita dell'epidermide (EGF)

La famiglia di fattori della crescita dell'epidermide comprende diversi membri che esercitano la loro funzione interagendo con il recettore EGFR, una proteina di transmembrana ad attività tirosinchinasica, espresso da numerose cellule. Agiscono sinergicamente con il fattore della crescita insulino simile (*Insulin-like Growth Factor* IGF), un altro fattore di crescita presente nel sito della ferita. EGF ha azione mitogenica per cellule epiteliali e fibroblasti.

Famiglia di fattori della crescita dell'endotelio vascolare (VEGF)

I fattori della famiglia VEGF esercitano la loro funzione biologica legandosi a recettori transmembranali ad attività tirosinchinasica. VEGF-A è stato identificato come il maggiore regolatore dell'angiogenesi durante la guarigione delle ferite, mentre VEGF-C e VEGF-D inducono la formazione di vasi linfatici che appaiono nel sito della ferita in concomitanza con i nuovi vasi sanguigni, ma regrediscono prima (Werner, Grose 2003).

Recettori per i fattori della crescita

Si tratta di recettori ad attività tirosinchinasica intrinseca. L'attivazione del recettore recluta Grb-Sos con l'attivazione della cascata delle MAPchinasi ERK. I ligandi tipici sono: EGF, PDGF, M-CSF, FGF.

Attivazione della cascata di ERK MAPchinasi da parte di recettori ad attività tirosinchinasica intrinseca. Il legame del fattore di crescita al recettore porta alla fosforilazione dei residui tirosinici recettoriali e alla dimerizzazione del recettore. La proteina Grb2 si lega al recettore e recluta Sos, un fattore di scambio per nucleotidi guanilici. Il complesso Grb2-Sos trasloca sulla membrana plasmatica dove opera lo scambio GDP con GTP sulla GTPasi Ras che viene così attivata. Ras è in grado di attivare una MAPKKK, Raf, che fosforila una MAPKK, MEK, che fosforila a sua volta la MAPK ERK. ERK dopo attivazione trasloca dal citoplasma al nucleo dove regola l'espressione genica di fattori di trascrizione.

Oltre alla via di trasduzione che innesca la cascata Ras-Raf-MEK-MAPK, coinvolta nel controllo della proliferazione e nel differenziamento cellulare, altro effettore di Ras è la chinasi PI-3K. PI-3K fosforila i fosfoinositidi che legano chinasi che attivano a loro volta altre chinasi come Akt (Clementi, Fumagalli UTET 2004 III ed.; Perez-Sala, Rebollo 1999).

PROSPETTIVE TERAPEUTICHE

Sebbene al momento il meccanismo molecolare alla base delle alterazioni fibrotiche dei tessuti non sia stato del tutto chiarito, è certo che un articolato sistema di stimoli intracellulari ed extracellulari concorra alla fibrogenesi. Nonostante questa complessità, molti studi concordano sul fatto che le citochine IL-6 e TGF- β 1 svolgano un ruolo centrale nella regolazione della fibrosi di un tessuto (Wang *et al.*, 2000; Barnes *et al.*, 2011).

Ricercando sostanze che potessero avere una eventuale attività antifibrotica, antinfiammatoria e cicatrizzante cutanea, l'attenzione si è focalizzata sul *Chelidonium majus*, una pianta usata sia nella Fitoterapia Occidentale che nella Medicina Tradizionale Cinese. Estratti grezzi di *C. majus*, come anche alcuni singoli componenti noti precedentemente isolati, presentano un ampio spettro di attività biologiche: antinfiammatorie, antibatteriche, antivirali, analgesiche, spasmolitiche del tratto gastrointestinale e delle vie biliari ed epatiche. Nella Fitoterapia Occidentale il *C. majus* è utilizzato per trattare epatopatie, ulcera gastrica, infezioni orali e lesioni cutanee (Gilca *et al.*, 2010). Sono riportati anche svariati usi topici per la soluzione di problemi dermatologici.

CHELIDONIUM MAJUS L.



Il *Chelidonium majus L.* appartiene alla famiglia delle *Papaveraceae* e cresce in Europa ed Africa Settentrionale. È un'erba perenne con fusti ramificati di 50-80 cm di altezza, con foglie pennatosette molli, glauche nella pagina inferiore. Le infiorescenze sono ad ombrello e portano 2-7 fiori gialli. Il frutto è una capsula siliquiforme (Maugini, 2006 VIII ed.).

La pianta produce un lattice aranciato che contiene una trentina di alcaloidi isochinolinici (chelidonina, cheleritrina, sanguinaria, protopina, berberina, stilopina, coptisina, canadina), flavonoidi, acidi fenolici, lattoni, carotenoidi, vitamine, fitosteroidi che vengono usati nella medicina popolare e in omeopatia (Gilca *et al.*, 2010).